

Rec'd PCT/PTC 11 MAR 2005

PCT/JP 03/11744

10/527703 10.03

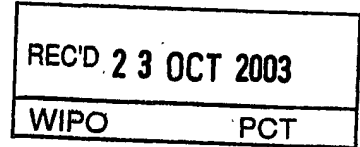
日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 9月13日
Date of Application:

出願番号 特願2002-268720
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-268720]



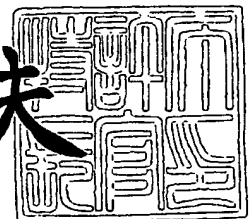
出願人 サントリー株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3080322

【書類名】 特許願

【整理番号】 1024537

【提出日】 平成14年 9月13日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C11C 3/10
C12P 7/64

【発明の名称】 エステル交換油脂またはトリグリセリドの製造方法

【請求項の数】 24

【発明者】

【住所又は居所】 京都府宇治市伊勢町毛語 1 0 0

【氏名】 角田 元男

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1 - 9 - 5 - 6 0 2

【氏名】 東山 堅一

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100092624

【弁理士】

【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100108110

【弁理士】

【氏名又は名称】 日野 あけみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9718791

【包括委任状番号】 9909459

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 エステル交換油脂またはトリグリセリドの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 真菌類が生産し、炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を20%以上含有する油脂またはトリグリセリドを50～100質量部と植物性油脂またはトリグリセリド0～50質量部とを1,3位特異的リパーゼを用いてエステル交換してエステル交換油脂またはトリグリセリドを製造する方法。

【請求項 2】 脱酸素状態でエステル交換反応を行う請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】 真菌類が生産する脂肪酸がn-6系の炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】 真菌類が生産する脂肪酸がn-9系の炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸である請求項または 2 に記載の製造方法。

【請求項 5】 真菌類が生産する脂肪酸がアラキドン酸である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 6】 脂肪酸がモルティエレラ (*Mortierella*) 属微生物が生産するアラキドン酸である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 7】 真菌類が生産する脂肪酸がジホモ- γ -リノレン酸である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 8】 真菌類が生産する脂肪酸がミード酸である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 9】 リパーゼがリゾプス・デレマー (*Rhizopus delemar*)、リゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*)、リゾムコール・ミーハイ (*Rhizomucor miehei*) またはリゾプス・オリザエ (*Rhizopus oryzae*) が生産するリパーゼである請求項 1～8のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 10】 請求項 1～9のいずれか 1 項に記載の製造方法で得られるエステル交換油脂またはトリグリセリド。

【請求項 11】 請求項 1～9のいずれか 1 項に記載の製造方法で得られる炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を20%以上含有する油

脂またはトリグリセリドであり、1分子中に炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を1残基含有するトリグリセリドを40%以上含有するおよび／または炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む同一の高度不飽和脂肪酸を3残基含有するトリグリセリドを4.0%以下の割合いで含有するエステル交換油脂またはトリグリセリド。

【請求項12】 請求項1～9のいずれか1項に記載の製造方法で得られる真菌類産生のn-6系の炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を20%以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1分子中にn-6系の炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を1残基含有するトリグリセリドを40%以上含有するおよび／または真菌類産生のn-6系の炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む同一の高度不飽和脂肪酸を3残基含有するトリグリセリドを4.0%以下の割合いで含有するエステル交換油脂またはトリグリセリド。

【請求項13】 請求項1～9のいずれか1項に記載の製造方法で得られる真菌類産生のn-9系の炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を15%以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1分子中にn-9系の炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を1残基含有するトリグリセリドを40%以上含有するおよび／または真菌類産生のn-9系の炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む同一の高度不飽和脂肪酸を3残基含有するトリグリセリドを4.0%以下の割合いで含有するエステル交換油脂またはトリグリセリド。

【請求項14】 請求項1～9のいずれか1項に記載の製造方法で得られるアラキドン酸を20%以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1分子中にアラキドン酸を1残基含有するトリグリセリドを40%以上含有するおよび／またはAA(1分子にアラキドン酸を3残基含有するトリグリセリド)を4.0%以下の割合いで含有するエステル交換油脂またはトリグリセリド。

【請求項15】 請求項1～9のいずれか1項に記載の製造方法で得られるジホモ- γ -リノレン酸を20%以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1分子中にジホモ- γ -リノレン酸を1残基含有するトリグリセリドを40%以上含有するおよび／またはDDD(1分子にジホモ- γ -リノレン酸を3残基含有するトリグリセリド)を4.0%以下の割合いで含有するエステル交換油脂またはトリグリセ

リド。

【請求項 16】 請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の製造方法で得られるミード酸を 20% 以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1 分子中にミード酸を 1 残基含有するトリグリセリドを 40% 以上含有するおよび／または MMM (1 分子にミード酸を 3 残基含有するトリグリセリド) を 4.0% 以下の割合いで含有するエステル交換油脂またはトリグリセリド。

【請求項 17】 炭素数 20 以上かつ 2 重結合を 2 個以上含む高度不飽和脂肪酸を 20% 以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1 分子中に炭素数 20 以上かつ 2 重結合を 2 個以上含む高度不飽和脂肪酸を 1 残基含有するトリグリセリドを 40% 以上含有するおよび／または炭素数 20 以上かつ 2 重結合を 2 個以上含む同一の高度不飽和脂肪酸を 3 残基含有するトリグリセリドを 4.0% 以下の割合いで含有するエステル交換油脂またはトリグリセリド。

【請求項 18】 アラキドン酸を 20% 以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1 分子中にアラキドン酸を 1 残基含有するトリグリセリドを 40% 以上含有するおよび／または AAA を 4.0% 以下の割合いで含有する油脂またはトリグリセリド。

【請求項 19】 ジホモ- γ -リノレン酸を 20% 以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1 分子中にジホモ- γ -リノレン酸を 1 残基含有するトリグリセリドを 40% 以上含有するおよび／または DDD を 4.0% 以下の割合いで含有する油脂またはトリグリセリド。

【請求項 20】 ミード酸を 20% 以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1 分子中にミード酸を 1 残基含有するトリグリセリドを 40% 以上含有するおよび／または MMM を 4.0% 以下の割合いで含有する油脂またはトリグリセリド。

【請求項 21】 請求項 10～20 のいずれか 1 項に記載油脂またはトリグリセリドを含有してなるヒト栄養組成物。

【請求項 22】 請求項 10～20 のいずれか 1 項に記載の油脂またはトリグリセリドを含有してなる食品組成物。

【請求項 23】 前記食品組成物が、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児食品、妊産婦用食品または老人用食品であることを

特徴とする請求項22記載の食品組成物。

【請求項24】 請求項10～20のいずれか1項に記載の油脂またはトリグリセリドを配合してなる動物用飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

微生物が生産する高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸としてなる油脂またはトリグリセリドをリパーゼのエステル交換反応によって改良する方法、ならびに改良された油脂またはトリグリセリド、ならびに改良された油脂を含むヒト栄養組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

高度不飽和脂肪酸のエイコサペンタエン酸（以下「EPA」と称する）、ドコサヘキサエン酸（以下「DHA」と称する）は、特に、動脈硬化症、血栓症などの成人病の予防効果や抗ガン作用、学習能の増強作用などで多くの生理機能を有していることが知られ、医薬品、特定保健用食品への利用で様々な試みがなされている。しかし、最近ではこれらの他の高度不飽和脂肪酸の生理機能にも注目が集まっている。

【0003】

高度不飽和脂肪酸の1種であるアラキドン酸は、血液や肝臓などの重要な器官を構成する脂肪酸の約10%程度を占めており（例えば、ヒト血液のリン脂質中の脂肪酸組成比では、アラキドン酸は11%、エイコサペンタエン酸は1%、ドコサヘキサエン酸は3%）、細胞膜の主要構成成分として膜の流動性の調節に関与し、体内の代謝で様々な機能を示す一方、プロスタグランジン類の直接の前駆体として重要な役割を果たす。特に最近では、乳幼児栄養としてのアラキドン酸の役割、神経活性作用を示す内因性カンナビノイド（2-アラキドノイルモノグリセロール、アナンダミド）の構成脂肪酸として注目されている。通常はリノール酸を富む食品を摂取すればアラキドン酸に変換されるが、成人病患者やその予備軍、乳児、老人では生合成に関与する酵素の働きが低下し、これらアラキドン酸は不足しが

ちとなるため、トリグリセリド型の油脂として、直接に摂取することが望まれる。

【0004】

EPAやDHAには、魚油という豊富な供給源が存在するが、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸および4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸(22:5 ω 6)は、従来の油脂供給源から殆ど得ることができず、現在では微生物を発酵して得た高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドが一般に使用されている。例えば、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを産生することのできる種々の微生物を培養して、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを得る方法が提案されている。この中でも、特にモルティエラ属の微生物を用いることによって、アラキドン酸高含有油脂またはトリグリセリドが得られることが知られている(例えば、特許文献1、2参照)。アラキドン酸が必須の用途、例えば、乳幼児栄養の分野、具体的には調合乳に発酵で得たアラキドン酸を構成脂肪酸として成るトリグリセリドが使われ始めてきている。

【0005】

乳幼児の栄養の分野ではアラキドン酸含有油脂を調合乳に添加して用いる方法が開示されている(特許文献3、4参照)。この添加原料に使うアラキドン酸含有油脂は真菌類によって生産され、分子的にみると、6~24%のAAA(1分子中にアラキドン酸を3残基含有するトリグリセリド)が含有されていることが特徴となっており、アラキドン酸含有率が高くなればAAAも高濃度になることが知られている(例えば、非特許文献1参照)。

【0006】

このAAAを高濃度含む油脂は植物油脂とは異なり、生理的な条件下で人の消化酵素(腓リパーゼ)の作用を受けにくいため、腓リパーゼ活性が低い幼児や老人には消化吸收されにくい油脂になっている(例えば、非特許文献1参照)。

人の母乳中に含まれるアラキドン酸の含量は全脂肪酸中に占める割合が0.5%であるため(例えば、非特許文献2参照)、上で述べたAAAのように1分子中にアラキドン酸が凝縮された形ではなく、トリグリセリド1分子に1残基のアラキドン酸

が存在する可能性が高いと推定される。従って、真菌類の醗酵によって得られたアラキドン酸含有油脂を脂肪酸含量の比率だけを考慮して、調整乳に配合しても良くない。

【0007】

油脂を酵素的に改変して物性（口溶性、結晶性、耐熱性）を改善する試みが多くなされてきた。その多くはカカオ代替脂の酵素的な合成に代表される植物性油脂の酵素的な改変であった（例えば、特許文献5、6参照）。ここで提示されている製造技術はリパーゼの反応性が良い植物油脂に対するものであり、反応性が悪い高度不飽和脂肪酸を多く含む油脂ではリパーゼの反応性の面から適応することが難しい。

【0008】

高度不飽和脂肪酸高含有油脂またはトリグリセリドは酵素的にも反応性が悪いため、酵素的な改変はあまりなされていなかったが、固定化酵素を工夫することで中鎖脂肪酸と高度不飽和脂肪酸高含有油脂とを用いて高度不飽和脂肪酸の構造脂質を作る試みがなされている（特許文献7、国際特許出願PCT/JP02-06702号参照）。本方法ではトリグリセリドの1,3位に結合した脂肪酸とオクタン酸とを置き換えるため、遊離型の高度不飽和脂肪酸が放出される。このため、高度不飽和脂肪酸高含有油脂は望めない。さらには、遊離脂肪酸の除去のため、精密蒸留等の高度で複雑な精製技術を必要とする問題点がある。

【0009】

藤本らは魚油（特にEPA, DHAを高含有の油脂）は極めて酸化されやすく、酸化防止剤の添加では十分な酸化安定性が得られていないので、油脂構造が高度不飽和脂肪酸の酸化安定性に与える影響について詳しく研究している（例えば、非特許文献3参照）。イワシ油（高度不飽和脂肪酸高含有）に特殊な油脂（中鎖脂肪酸のC8, C14のトリグリセリド）を加え、ランダム型リパーゼでエステル交換することで酸化安定性が向上することを見出し、化学的に合成した高度不飽和脂肪酸のトリグリセリドのEEE（トリーEPA）を使って高度不飽和脂肪酸が分子間に散らばった存在形態と、同一分子内に凝縮された状態とで酸化されやすさを比較し、この分散型がよいことも確認している。

【0010】

魚油等に含まれる高度不飽和脂肪酸の酸化を防ぐため、エステル交換反応して油脂を安定化する方法も開示されている（特許文献8参照）。しかし、魚油等に含まれる高度不飽和脂肪酸はエステル交換反応に用いるリパーゼの反応性が低い。そこで本法ではリパーゼの反応性が高い植物性油脂を用い、魚油等から精製した高度不飽和脂肪酸含有油脂を大量希釈してリパーゼの反応性を確保している。このため、結果的には安定化された油脂中の高度不飽和脂肪酸含量を高めることができない。

【0011】

従って、乳幼児用の調合乳、食品、健康食品の分野で応用が期待でき、しかも消化吸収性が高く酸化劣化しにくい特性を有する高度不飽和脂肪酸高含有油脂またはトリグリセリドが望まれている。

【0012】

【特許文献1】

特開昭63-44891号公報

【特許文献2】

特開昭63-12290号公報

【特許文献3】

特開平11-151075号公報

【特許文献4】

開平10-191886号公報

【非特許文献1】

Jim-Wen Liu他著「試験管反応における真菌油の加水分解：アラキドン酸含有トリグリセリドの分子種（In Vitro Hydrolysis of Fungal Oils: Distribution of Arachidonic Acid-Containing Triacylglycerol molecular Species）」米国油化学会誌(J. Am. Oil Chem. Soc.)、75、p.507-510 (1998)

【非特許文献2】

Christie, W.W. 著、Hamilton, R.J. および Russell, J.B. 編「トリグ

リセリドにおける脂肪酸の結合位置 (The Positional Distribution of Fatty Acids in Triglycerides)」、油脂の分析 (Analysis of Oil and Fats)、p. 313-339、Elsevier Applied Science (ロンドン)、(1986)

【特許文献 5】

特開昭55-71797号公報

【特許文献 6】

特開昭58-42697号方法

【特許文献 7】

特開平08-214891号公報

【非特許文献 3】

藤本健四郎著「油脂構造が高度不飽和脂肪酸の酸化安定性に与える影響」、科学と工業、75、p. 53-60、社団法人 大阪工研協会発行(2001)

【特許文献 8】

特開平6-287593号公報

【特許文献 9】

特開平5-91887号公報

【特許文献 10】

特開平5-91888号公報

【特許文献 11】

国際公開98/39468号パンフレット

【非特許文献 4】

東山他著「モルティエレラ・アルピナ 1S-4株によるアラキドン酸生産性の増強(Enhancement of Arachidonic Acid Production by Mortierella Alpina 1S-4)」、米国油化学会誌 (J. Am. Oil Chem. Soc.), 75、p. 1501-1505 (1998)

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

乳幼児用の調合乳、食品、健康食品の分野で応用が期待でき、しかも消化吸収性が高く酸化劣化しにくい特性を有する高度不飽和脂肪酸高含有油脂またはトリグリセリドが求められている。これを実現するため、リパーゼのエステル交換反応を用いて、アラキドン酸に代表される高度不飽和脂肪酸含有油脂またはトリグリセリドを改良し、高度不飽和脂肪酸を分散させた形の油脂を製造する方法およびそれを含有する組成物およびそれらを含有する食品や健康食品を提供するものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

高度不飽和脂肪酸含量が高く、しかも消化吸収性が高く酸化劣化しにくい特性を有する高度不飽和脂肪酸高含有油脂またはトリグリセリドは、真菌類が生産し炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を20%以上含有する油脂またはトリグリセリドを50～100質量部と植物性油脂またはトリグリセリド0～50質量部とを1,3位特異的リパーゼを用いて脱酸素状態にして、反応温度を上げてエステル交換することにより得ることができた。

【0015】

すなわち、本発明は、

固定化酵素を用いることで熱安定性を高め、高い反応温度での酵素の使用を可能にするとともに、高温下での反応では原料・反応中油脂の酸化劣化が危惧されることから、固定化酵素自体に含まれている酸素を除去する方法を見出し、酸化劣化を防止して、実用化に適した酵素反応を完成した；

エステル交換反応は加水分解反応とエステル合成反応との可逆反応であるため、酵素の活性化のための水分を酵素の活性化後、効率的に除去して副次的に生成する遊離脂肪酸・モノグリセリド・ジグリセリドの量を抑える方法を見出し、実用化に適した酵素反応を完成した；

ことにより、エステル交換反応で変換した油脂の商業的生産に適した方法を提供するものである。

従って、本発明は、真菌類が生産する高度不飽和脂肪酸含有油脂またはトリグリセリドを原料として、リパーゼのエステル交換反応を利用した食用エステル交

換油脂を製造する方法ならびにこれら油脂を含む組成物を提供する。

【0016】

【発明の実施の形態】

母乳脂質中のアラキドン酸含量は1%（質量%）に満たないため、トリグリセリド1分子中に含まれるアラキドン酸残基はせいぜい1残基と推定される。モルティエラ (*Mortierella*) 属真菌の醗酵法によって製造されたアラキドン酸高含有油脂 (SUNTGA40S: サントリー (株)、商品名) の分子種を以下の表1に示す。

【0017】

【表1】

表1 SUNTGA40Sのアラキドン酸の存在形態

分子種	存在量 (質量%)
AAA	10.57
XAA	37.56
XXA	26.52
XXX	25.35

【0018】

この場合、Aはトリグリセリドに結合したアラキドン酸を、Xはアラキドン酸以外のトリグリセリドに結合した脂肪酸を示し、具体的には「AAA」は1分子中にアラキドン酸を3残基含有するトリグリセリドを、「XAA」とはアラキドン酸残基が2残基、アラキドン酸以外の脂肪酸が1残基結合したトリグリセリドを、「XXA」とはアラキドン酸が1残基、アラキドン酸以外の脂肪酸が2残基結合したトリグリセリドを示す。アラキドン酸を含有するトリグリセリドは全トリグリセリドの74.7%であるが、母乳中に存在すると推定されるXXAは26.52%で、非存在型と考えられるAAAやXAAが48%も存在する。この48%ものAAAやXAAをXXAの形態に変

換することで、母乳に近いアラキドン酸の形態になると考えられる。

【0019】

本発明者らは以上に示した醗酵生産した真菌由来のアラキドン酸高含有油脂またはトリグリセリドの改良を目的に、脱酸素状態で1,3位特異的リパーゼを用いて比較的少量の植物油脂とで、エステル交換油脂を試作した。真菌油アラキドン酸油脂に多量に含まれ、消化吸収されないAAAを原料に、1,3位に結合したアラキドン酸を分散させ、人の母乳の構造形態（XXA）に近づけることにも成功した。

本エステル交換法で改良された油脂は乳幼児の栄養の分野で調合乳に添加して用いることの他、食品、健康食品等に広く利用可能である。

【0020】

酵素の活性化と酸素除去の方法について

油脂を酵素的にエステル交換して改善する方法は従来技術でも述べたように古くから行われてきた。本アラキドン酸高含有油脂にはリパーゼの生理的な反応条件では作用しにくいAAAを始め多くのアラキドン酸残基を含んでおり、エステル交換反応における酵素の反応性に問題がある。エステル交換反応の効率を高めるためにはリパーゼを固定化して、耐熱性を付与し反応温度を上げることでエステル交換率の向上が望める（例えば、特許文献7、国際特許出願PCT/JP02-06702号参照）。しかし、反応効率向上のために反応を高温にすると、原料のアラキドン酸高含有油脂は酸化劣化を引き起こされやすくなる。特に固定化酵素を用いた場合、固定化担体中に染み込んだ酸素の除去が問題となってくる。そこで発明者らはこの固定化酵素中に含まれる酸素の効率的な除去法を見出し、この低酸素条件下でエステル交換する方法を見出した。

【0021】

油脂の酸化度合いを示す1つのパラメータにPOV値（過酸化価）が広く使われている。反応系に入る酸素の量を変えてエステル交換反応を行い、POV値を測定することで油脂の酸化の度合いを比較検討した。酸素の量は以下の4レベルで行った。すなわち、最も脱酸素レベルが高い「脱気&窒素ブロー」、常識的に窒素を通気して窒素置換するレベル「窒素ブロー」、反応容器を全く窒素置換せず行うレベル「窒素無置換」、最後に固定化酵素の担体のみを使い、窒素無置換

の状況でコントロールとした「コントロール」。30、45、55℃の温度で所定期間反応した後にPOV値を測定した。表2に示すように、残存する酸素の量に比例して、POV値が上昇することがわかり、特に常識的に窒素を通気して窒素置換するレベルでの脱気状態「窒素ブロー」では、反応温度の上昇とともに、POV値が上昇することから、酸素の除去が不十分と考えられた。このことはこの条件で反応すれば油脂の劣化が防げられないことを意味し、脱酸素レベルを次の「脱気&窒素ブロー」まで上げることでPOV値の増加が抑えられ、質の良い油脂が得られることがこの結果から見出せた。

【0022】

【表2】

表2 各種条件下で反応した時のPOV値			
	30℃、1日	45℃、3日	55℃、1日
脱気&窒素ブロー	0.87	0.88	0.87
窒素ブロー	1.07	1.23	2.75
窒素無置換	1.28	1.86	3.15
コントロール	2.69	4.50	4.05

(POV : meq/kg油脂)

【0023】

リゾプス・デレマー (*Rhizopus delemar*、現*Rhizopus oryzae*) のリパーゼの場合、予め少量の水分を加え(約2%)、酵素を活性化する必要がある。従って、活性化と固定化酵素中の余分な水分を抜くための操作が必要となる。この操作を加え脱酸素する操作が必要になるが、酸素の除去の操作は酵素の活性化や水分除去工程で同時に行うことができる。酵素の活性化時、固定化酵素に原料油脂と少量の水を加え、30～45℃で約1日反応させて酵素を活性化する。固定化酵素の活性化だけであれば高価な高度不飽和脂肪酸含有油脂の代わりに安価な植物油脂を使ってもよい。酸素の除去は固定化酵素に少量の水分を含む原料油脂を加えた段階でも、あるいは油脂を加える前でもよく、真空ポンプ等の減圧機を用いて原料

油脂と固定化酵素から脱気し、常圧に戻す際には空気でリークさせるのではなく、窒素ガスをリークすることで行える。この減圧・常圧の操作を繰り返すことで固定化酵素中の酸素を取り除くことができる。活性化反応終了後、油脂を取り除き、油脂を吸った固定化酵素に対してさらに上と同様の減圧-窒素ガスリークを繰り返すことで酸素を除去し、酸素を除去した（窒素置換された）原料油脂を加えてエステル交換すると、高温の条件下でも油脂の酸化劣化は防ぐことができる。

【0024】

酵素の活性化に用いた水分の除去や酵素に含まれる水分除去の方法について
上の操作で活性化した固定化酵素から余分な水分を除去する必要がある。余分な水分が存在するとリパーゼによる加水分解反応が進行し、エステル交換反応中に副次的にジグリセリド・モノグリセリド・遊離脂肪酸が生成する。これを防ぐ目的で、反応系から水分を除く必要がある。余分な水分を除去するには活性化した固定化酵素から活性化に用いた油脂を取り除き、反応原料の油脂（予め、脱酸素・脱水した油脂）で一度洗浄後、45℃で原料油脂と1日反応すればよい。この次の反応からはジグリセリド等の量が低く抑えられたエステル交換油脂が得られる。製造コストを低減する目的であれば、活性化と水分除去反応に高価な高度不飽和脂肪酸含有油脂の代わりに安価なパーム油等の植物油脂を用いても良い。

【0025】

リゾプス・デレマー (R. delemar) の固定化酵素の場合は水による酵素の活性化が必要であったが、市販されている固定化酵素 (Rhizomucor miehei のリパーゼ、ベーリンガー・マンハイム社製、キラザイム L-9, c.-f., C2, lyo) の場合には、水による酵素の活性化は必要なく固定化酵素に含まれる微量の水分により活性型になっている。しかし、この固定化酵素にも余分な水分が含まれており、リゾプス・デレマー (R. delemar) の場合と同様に水分を除去する必要がある。この水分除去の方法は以上で述べた方法を使えばよく、何ら特別な操作は必要ない。さらに、この酵素の場合には酸素の除去はこの脱水の工程で行えば良い。

【0026】

酵素反応の反応槽について

これまでは酵素反応がバッチ式でエステル交換反応を行った場合について述べた。

固定化酵素を用いて油脂のエステル交換反応を行う方法として、バッチ式の他にカラム式の反応方法がある。すなわち、固定化酵素をカラム式のジャケット付容器に詰め、保温・加熱してカラムを温調しながら、原料油脂をカラムに導入し、出口からエステル交換油脂を取り出す方法である。場合によっては油脂を循環させながらカラムを通し、変換率を高めることも可能である。この場合には、活性化時や水分除去時に原料油脂をカラムに通し内部の固定化酵素に油をなじませて、減圧による脱気と強制的な窒素ガスのブローを組み合わせることで酸素の除去が可能である。活性化して水分除去した後に、油脂のエステル交換反応を行うと良い。

【0027】

エステル交換反応の原料油脂

高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを50～100質量部と植物性油脂またはトリグリセリド0～50質量部とを混合すると、均一な状態の液状の油脂になり、これまでに記載した方法で酸素を除去した固定化酵素によってエステル交換反応を行い、高度不飽和脂肪酸を含有する油脂を改良することができる。

【0028】

<植物油脂>

反応の原料の植物性油脂は一般に食用として使用されているものを使うことができる。この植物油脂はエステル交換の飽和脂肪酸の供給源の一つとして用いる。例えば、大豆油、サフラワー油、オリーブ油、米ぬか油、ごま油等のリノール酸系、オレイン-リノール酸系の油脂やパーム油、パーム核油、カカオ油、やし油、ラード油等の飽和脂肪酸系の油脂が挙げられる。酸化に対する抵抗性を付与することから、また、母乳成分に近づける意味から飽和脂肪酸を多く含む飽和脂肪酸系の油脂がより好ましい。

【0029】

エステル交換の飽和脂肪酸の供給源に用いる植物性油脂は飽和脂肪酸系のパー

ム油と比較的不飽和脂肪酸が多いリノール酸系の大豆油と比較するとエステル交換反応でのAAAの減少速度は両油脂ともほぼ同等であり、油脂の消化吸収性に問題となるAAAの含量には差が見られず、消化吸収性の良い油脂への改善効果を示すと考えられる。しかし、エステル交換反応で導入される脂肪酸の違いから、酸化劣化に対する強度には差がある。

【0030】

さらにこれら油脂から分別したものやその他の部分水添により飽和脂肪酸含量を高めた油脂を上げることができるが、使用しうる油脂はこれに限定されるものではない。

【0031】

＜高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸としてなる油脂＞

高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを産生しうる微生物を培養することが必須である。ここでいう微生物としては、炭素数が20以上で二重結合は2以上の ω 6系、 ω 9系または ω 3系の高度不飽和脂肪酸の少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸を主にトリグリセリドの構成脂肪酸として産生する微生物が望ましい。

【0032】

そして、炭素数が20以上で二重結合は2以上の ω 6系、 ω 9系または ω 3系の高度不飽和脂肪酸としては、ジホモ- γ -リノレン酸 (8,11,14-エイコサトリエン酸)、アラキドン酸 (5,8,11,14-エイコサテトラエン酸)、7,10,13,16-ドコサテトラエン酸 (22:4 ω 6)、DPA ω 6 (4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸)、8,11-エイコサジエン酸、ミード酸 (5,8,11-エイコサトリエン酸)、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸 (20:4 ω 3)、EPA (5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸)、DPA ω 3 (7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸) およびDHA (4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸) を挙げることができる。

【0033】

従って、本発明においては、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを産生しうる微生物であればすべて使用することができる。例えば、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドの生産

能を有する微生物としては、モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クロドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属、サプロレグニア (Saprolegnia) 属に属する微生物を挙げることができる。モルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物では、例えばモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila)、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) 等を挙げることができる。具体的にはモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IF08571、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IF05941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68等の菌株を挙げることができる。例えば、DHAを産生する微生物として、クリプテコデニウム (Crypthecodenium) 属、スラウトキトリウム (Thrautochytrium) 属、シゾキトリウム (Schizochytrium) 属、ウルケニア (Ulkenia) 属、ジャポノキトリウム (Japonochytrium) 属またはハリフォトリス (Haliphthoros) 属に属する微生物を挙げることができる。

【0034】

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、および米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, ATCC) および、Centrralbureau voor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また本発明の研究グループが土壌から分離した菌株モルティエレラ・エロンガタ SAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。

【0035】

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、または予め培養して得られた種培養液あるいは種培養より回収した菌体を、液体培地または固体培地に接種し本培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール、糖化澱粉等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー、大豆タンパク、脱脂ダイズ、綿実カス等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができるが、特に大豆から得られる窒素源、具体的には大豆、脱脂大豆、大豆フレーク、食用大豆タンパク、おから、豆乳、きな粉等が挙げられるが、特に、脱脂大豆に熱変性を施したものの、より好ましくは脱脂大豆を約70～90℃で熱処理し、さらにエタノール可溶成分を除去したものを単独または複数で、あるいは前記窒素源と組み合わせて使用することができる。この他必要に応じて、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン以外に、鉄、銅、亜鉛、マンガン、ニッケル、コバルト等の金属イオンやビタミン等を微量栄養源として使用できる。

【0036】

これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上、一般に炭素源は総添加量は0.1～40質量%、好ましくは1～25質量%、窒素源の総添加量は2～15質量%、好ましくは2～10質量%とするのが望ましく、より好ましくは初発の炭素源添加量を1～5質量%、初発の窒素源添加量を3～8質量%として、培養途中に炭素源および窒素源を、さらにより好ましくは炭素源のみを流加して培養する。なお、不飽和脂肪酸の収率を増加せしめるために、不飽和脂肪酸の前駆体として、例えば、ヘキサデカン若しくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸若しくはリノール酸のごとき脂肪酸またはその塩、復は脂肪酸エステル、例えばエチルエステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル；またはオリーブ油、大豆油、なたね油、綿実油若しくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、または組み合わせて使用できる。基質の添加量は培地に対して0.

001～10質量%、好ましくは0.5～10質量%である。またこれらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

【0037】

高度不飽和脂肪酸を産生する微生物の培養温度は使用する微生物によりことなるが、5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。このような温度管理によっても、生成脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸の割合を上昇せしめることができる。培地のpHは4～10、好ましくは5～9として、通気攪拌培養、振盪培養、固体培養、または静置液体培養を行う。本培養は通常2～30日間、好ましくは5～20日間、より好ましくは5～15日間行う。

【0038】

モルティエセラ属モルティエセラ亜属に属する微生物は、アラキドン酸を主たる構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを産生しうる微生物として知られているが、本発明者らは、上記菌株に変異処理を施すことによって、ジホモ- γ -リノレン酸を主たる構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを産生しうる微生物（特許文献9参照）や、 ω 9系高度不飽和脂肪酸を主たる構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを産生しうる微生物を（特許文献10参照）得ている。さらに、高濃度の炭素源に耐性を有する微生物（特許文献11参照）も得ており、これら微生物は、モルティエセラ属モルティエセラ亜属の微生物である。しかし、本発明はモルティエセラ属モルティエセラ亜属に属する微生物に限定しているわけではなく、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂またはトリグリセリドを産生しうる微生物を用いることができる。

【0039】

上記のように培養した微生物から、粗油を得る方法として、培養終了後、培養液をそのままかあるいは殺菌、濃縮、酸性化などの処理を施した後、自然沈降、遠心分離および／または濾過などの常用の固液分離手段により培養菌体を得る。固液分離を助けるために、凝集剤や濾過助剤を添加してもよい。凝集剤としては、例えば、塩化アルミニウム、塩化カルシウム、アルギン、キトサンなどを使用できる。濾過助剤としては、例えば、珪藻土を使用できる。培養菌体は好ましく

は、水洗、破碎、乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾、流動層乾燥、凍結乾燥などによって行うことができる。乾燥菌体から粗油を得る手段としては、有機溶剤による抽出法や圧搾法を用いることができるが、好ましくは窒素気流下で有機溶剤によって抽出する。有機溶剤としてはエタノール、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル、アセトン等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒も用いることができる。しかしながら、粗油の取得に用いる抽出法を上記の方法に限定しているわけではなく、菌体内の油脂を効率的に抽出する手法はすべて使用することができる。例えば、超臨界抽出法なども有効な手段として使用することができる。

【0040】

有機溶剤や超臨界流体で抽出された抽出物から減圧下などの条件下で有機溶剤や超臨界流体成分を除去することにより、目的とする粗油を得ることができる。また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール、アセトン等の水に対して相溶性の溶媒、またはこれらと水および／または他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

【0041】

また、粗油だけでなく精製油脂をエステル交換の基質として用いることもできる。油脂精製工程として、脱ガム、脱酸、脱臭、脱色、カラム処理、分子蒸留、ウインタリングなどの常法の工程を用いることができる。

【0042】

＜エステル交換反応に用いるリパーゼ＞

本発明で用いることのできるリパーゼとして、例えば、リゾプス (*Rhizopus*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属などの微生物が産生するもの、ブタ膵臓リパーゼなどを挙げることができる。かかるリパーゼについては、市販のものを用いることができる。例えば、リゾプス・デレマー (*Rhizopus delemar*) のリパーゼ (田辺製薬 (株) 製、タリパーゼ) (*Rhizopus delemar* は現在、分類学上 *Rhizopus oryzae* に分類されている)、リゾプス・

ニベウス (Rhizopus niveus) のリパーゼ (天野エンザイム (株) ニューラーゼ F3G) (Rhizopus niveus も分類学上 Rhizopus delemar と同じ菌とされ、Rhizopus oryzae という菌名で統一されている)、リゾムコール・ミーハイ (Rhizomucor miehei) のリパーゼ (ノボ・ノルディスク (株) 社製、リボザイム IM、またはベーリンガー・マンハイム社製、キラザイム L-9, c.-f., C2, lyo)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) のリパーゼ (天野エンザイム (株)、リパーゼ A) 等が挙げられるが、これら酵素に限定しているわけではなく、1,3-位特異的リパーゼであればすべて使用することができる。

【0043】

上記リパーゼの使用形態は、高度不飽和脂肪酸に対する反応効率を高める目的であるいは繰り返し使用するために安定性を付与する目的で固定化担体に固定化したリパーゼを使用することが望ましい。固定化担体として、セライト、イオン交換樹脂、セラミックス、たんぱく質を吸着することができる吸着樹脂などが用いられる。例えば、セライトでは粉末状珪藻土、粒状珪藻土、ポリマー系イオン交換樹脂では Dowex MARATHON WBA (ダウケミカル)、ダイヤイオン WA30 (三菱化学 (株))、セラミックスでは SM-10 (日本ガイシ)、吸着樹脂ではダイヤイオン HP20 (三菱化学 (株)) 等が挙げられる。

上記のイオン交換樹脂等は一例であり、樹脂は日々進化し、より良いものが市場に出回ってくる。これら樹脂の改良型が出回った場合でも使用できると考えられる。

【0044】

<エステル交換反応の反応温度および時間>

エステル交換反応は酵素の反応性から考えると 30~60℃ が好ましい。連続的に固定化酵素を用いて反応する場合には固定化酵素の安定性を鑑み、30~50℃ で行うことが好ましい。反応に要する時間は短ければ短いほどよいが、反応後のエステル交換油脂中に含まれる XXA や AAA の含量から考えて 1~7 日間反応が好ましい。反応時には原料油脂 (高度不飽和脂肪酸酸高含有油脂) が酸化されやすいため、先に記載した酸素の除去対策を行って、無酸素下で反応することが望ましい。

【0045】

＜エステル交換反応後の精製＞

このようにしてエステル交換反応で改良された油脂は酵素反応槽（カラム反応でも、バッチ式反応でも）から容易に固定化酵素と分けて分別できる。出来上がった油脂の成分の大半はトリグリセリド型の油脂であり、脱酸、脱ガム、脱色、脱臭のような通常の油脂の精製に用いられる方法で精製することができる。

【0046】

本発明の油脂は微生物が生産する高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸としてなる油脂またはトリグリセリドをリパーゼのエステル交換反応によって改良された油脂またはトリグリセリドであり、炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を20%以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1分子中に炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む高度不飽和脂肪酸を1残基含有するトリグリセリドを40%以上含有するおよび／または炭素数20以上かつ2重結合を2個以上含む同一の高度不飽和脂肪酸を3残基含有するトリグリセリドを4.0%以下の割合で含有するエステル交換油脂またはトリグリセリドがあげられる。

本発明における油脂は好ましくはトリグリセリドを90%以上含有する。

【0047】

本発明の油脂、例えば、アラキドン酸を20%以上含有する油脂またはトリグリセリドであり、1分子中にアラキドン酸を1残基含有するトリグリセリドを40%以上含有するおよび／またはAAAを4.0%以下の割合で含有するエステル交換油脂またはトリグリセリド等の用途は用途に関しては無限の可能性があり、食品、飲料、化粧品、医薬品の原料並びに添加物として使用することができる。そして、その使用目的、使用量に関して何ら制限を受けるものではない。

【0048】

例えば、食品組成物としては、一般食品の他、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児用食品、妊産婦食品または老人用食品等を挙げることができる。油脂を含む食品例として、肉、魚、またはナッツ等の本来油脂を含む天然食品、スープ等の調理時に油脂を加える食品、ドーナッツ等の熱媒体として油脂を用いる食品、バター等の油脂食品、クッキー等の加工時に油脂を加える加工食品、あるいはハードビスケット等の加工仕上げ時に油脂を噴霧また

は塗布する食品等が挙げられる。さらに、油脂を含まない、農産食品、醗酵食品、畜産食品、水産食品、または飲料に添加することができる。さらに、機能性食品・医薬品の形態であってもよく、例えば、経腸栄養剤、粉末、顆粒、トローチ、内服液、懸濁液、乳濁液、シロップ等の加工形態であってもよい。

【0049】

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明は、実施例に限定されない。

【0050】

【実施例】

実施例1 固定化酵素の製作（1,3-位特異的リパーゼの固定化による安定性の付加と脱酸素化）

イオン交換樹脂担体（Dowex MARATHON WBA：ダウケミカル）100gを、リゾプス・デレマー（*Rhizopus delemar*）リパーゼ水溶液（タリパーゼ現末、12.5%：田辺製薬（株））80mlに懸濁し、減圧下で乾燥させて固定化酵素を得た。次に、アラキドン酸を40%含有するトリグリセリド（SUNTGA40S、サントリー（株）、商品名）（25g）、パーム油（15g）、上記固定化リパーゼ（4g）、水（800 μ l）を密閉できるボトルに秤量した。ボトルを半開きの状態でデシケーター中に入れ、このデシケーターに真空ポンプをつなぎ中味を減圧した（デシケーター中のボトルに油脂とともに入った固定化酵素担体から油中に泡状となって酸素を含む空気が放出された）。次にこのデシケーター中を常圧に戻すため、窒素ガスをデシケーターへリークした。この減圧化、常圧化の操作を繰り返し、固定化担体のマトリックス中に存在した酸素を窒素で置き換え、ボトルを密閉した。次に固定化酵素を活性化するため、30℃で24時間、振とう（100rpm）した。活性化終了後、活性化に用いた油脂を取り除き、もう一度脱酸素操作を施し、活性化された固定化酵素を得た。他の植物油脂とのエステル交換反応を行う場合には、固定化酵素を活性化する時にパーム油の代わりにエステル交換反応に用いる植物油脂を使って、上記パーム油と同様にSUNTGA40S（25g）、植物油脂（15g）、上記固定化リパーゼ（2g）、水（800 μ l）を混ぜ、上記記載の脱酸素化の操作と、固定化酵素の活性化操作を施し、エステル交換反応に使用した。

【0051】

実施例2 油脂中の脂肪酸含量測定方法

油脂を約10~20mgネジ口試験管に採取し、これに塩酸メタノール2mLおよびジクロロメタン1mLを添加し、試験管の口を密封して、50℃で3時間反応させた。反応終了後、室温まで冷却した後、ヘキサンを添加して脂肪酸メチルエステルを抽出し、回収したヘキサン層を減圧濃縮した。得られた脂肪酸メチルエステルを、総脂肪酸メチルエステル濃度が約1%となるようにヘキサンに溶解し、ガスクロマトグラフィーの分析に供した。ガスクロマトグラフィーの分析条件および成分同定は、「Official Methods and Recommended Practices of the AOCS 5th Edition (American Oil Chemists' Society, 1998)」の、Fatty Acid Composition by GLC (Method Ce 1b-89)に準じ、カラムはSupelcowax-10を用いた。検出されたピーク面積総和に対するアラキドン酸メチルエステルのピーク面積の割合を、油脂中のアラキドン酸含量とした。アラキドン酸以外の脂肪酸に関しても、同様の方法で各々の脂肪酸含量を求めた。

【0052】

実施例3 トリグリセリドの分析方法

HPLCを用いて以下の条件で分析し、酵素反応で改変した油脂中の各トリグリセリド含量を測定した。

カラム：逆相カラム (Cosmosil 4.6 x 250 mm 5C18-MS)

溶媒：アセトン/アセトニトリル (1:1) 1 ml/min

分析時間：55分

カラムオープン温度：40℃

検出器：示差屈折計検出器 (セル温度40℃)

サンプル：油脂またはトリグリセリドをクロロホルムに溶解させた10%溶液を5 μ lを注入

【0053】

以上の測定条件で各種トリグリセリドを分析した。各トリグリセリドの分子種の決定は特表2000-513575で開示された方法に準じて行った。すなわち、上の条件で各トリグリセリドのピークを分取し、加水分解後、メチルエステルに変換し

た。ガスクロマトグラフィーを用いて、その分子種を決定した。

【0054】

この方法により、SUNTGA40Sやエステル交換反応で得られた油脂の各トリグリセリドを分析し、計算することで、SUNTGA40Sのアラキドン酸の存在形態やXXAの各々のトリグリセリドの比率や含量を示すことができた。XXAはLLA、PGA、OLA、PLA、OOA、POA、PPA、SOA、PSA、SSA、LC22Aの質量%の総和である。ここで使われている略号は、L：リノール酸、P：パルミチン酸、G： γ -リノレン酸、O：オレイン酸、S：ステアリン酸、C22：直鎖飽和の炭素数22の脂肪酸、X：アラキドン酸以外の脂肪酸、A：アラキドン酸をそれぞれ示している（それぞれの脂肪酸残基のグリセリンへの結合位置は規定されていない）。

【0055】

実施例4 実施例1で得た活性化型の固定化リパーゼを用いてアラキドン酸含有油脂（SUNTGA40S；アラキドン酸として約40%含有）の改変を行った。

以下の表3の原料組成で30℃で振とう（100rpm）して酵素反応を行い、エステル交換反応の進み具合を確認する目的でサンプリングしながら反応し続けた。サンプリングした油脂のトリグリセリド分析を行うことでAAAの変化量を測定した。

【0056】

【表3】

表3 反応の原料組成

SUNTGA40S	25g
パーム油 または 大豆油	15g
固定化リパーゼ	2g

【0057】

図1には高度不飽和脂肪酸高含有油脂またはトリグリセリドの一種であるアラキドン酸含有油脂を植物油脂のパーム油や大豆油と混合して、エステル交換した

時のAAA含量の変化をしめしたものである。飽和脂肪酸含量の高いパーム油とのエステル交換でも、飽和脂肪酸含量が低く不飽和脂肪酸含量の高いリノール酸系油脂の大豆油とではAAAの減少速度は同じであった。

これは植物油脂の種類によらず、混合比率が同じであれば、本発明にかかるAA Aの消失速度が同じ事を示した証拠である。

【0058】

実施例5 CDM試験

酵素的に変換したアラキドン酸高含有油脂の酸化安定化を確認する目的で、酵素変換油脂を試作し、CDM試験で酸化安定性を測定した。CDM試験は試料油脂を反応容器で加熱（一定温度）しながら、清浄空気を送り込み、酸化により生成した揮発性分解物を水中に捕集し、水の導電率が急激に変化する折曲点までの時間で試料油脂の安定性を表す。この時間が短いほど酸化劣化しやすい油脂ということになる。

【0059】

実施例3に基づき、固定化酵素（活性化済）を原料油脂（40g）に対し、2倍量（4g）加え、30℃、100rpmで反応した。反応後、油脂と固定化酵素をデカントで分離して反応油脂を得た。得られた油脂のAAA含量をHPLCで分析するとともに、CDM試験により安定性について分析した。反応時間を変えて、AAA含量の異なる修飾油脂1および修飾油脂2を得た。

【0060】

【表 4】

表4 修飾油脂（エステル交換油脂）のAAA含量と安定性

試料	CDM (Hr)	AAA含量 (%)
パーム油/SUNTGA40S		
修飾油脂 1	6.4	3.90
修飾油脂 2	5.7	4.44
未修飾油脂	4.6	6.46
大豆油/SUNTGA40S		
修飾油脂 1	4.1	3.69
修飾油脂 2	3.6	4.28
未修飾油脂	3.5	7.01

【0061】

表4に示すように、反応原料の植物油脂はパーム油のような飽和脂肪酸系油脂を用いることで、問題のAAA含量も減少し、油脂の酸化に対する安定性が高くなったことが示された。

一方、リノール酸系油脂の大豆油を反応原料に用いた場合、AAAはパーム油同様に減少することが示せたが、CDMで示される安定性についてはパーム油ほど高い効果は得られなかった。

【0062】

実施例6 パーム油で希釈した高アラキドン酸含有油脂（SUNTGA40S）のエステル交換反応における各成分の時間的変化

真菌類が生産する高アラキドン酸含有油脂はAAAを多く含むため、母乳のアラキドン酸の存在形態（XXA）に近づけるため、リパーゼのエステル交換反応でAAAからXXAへ変換し、時間的な経過と各成分の比率の変化を実験的に測定した。

【0063】

【表 5】

表5 エステル交換反応における各トリグリセリド成分の時間変化

トリグリセリド成分 (%)	経過時間 (hr)			
	0 hr	48 hr	96 hr	176hr
AAA	6.37	5.16	4.33	3.41
XAA	23.19	19.09	17.00	14.86
XXA	16.11	29.33	35.41	40.55

【0064】

固定化酵素は実施例1で行った方法で活性化し、活性化型固定化酵素2gに対してSUNTGA40Sを25g、パーム油を15g加え脱酸素後、30℃で反応した。各時間にサンプリングし、実施例2で記載した方法（HPLC分析）で各トリグリセリドを分析し、各成分を算出した。表5に示すように、時間とともにAAAが減少し、この変換体と考えられるXXAが増加した。AAAが油脂混合後の1/2近く、XXAが2倍以上になるためには、この条件では1週間の時間を要した。次の実施例で反応温度や、固定化酵素の添加量について検討し、最適化を図っている。

【0065】

実施例7 エステル交換反応における反応温度の影響

実施例1で調製した固定化酵素を用いて、エステル交換反応における反応温度の影響について検討した。固定化酵素は実施例1で行った方法で活性化し、活性化型固定化酵素2gに対してSUNTGA40Sを25g、パーム油を15g加えて、脱酸素後に各温度で反応した。反応1日後に反応した油脂をサンプリングし、実施例2で記載した方法（HPLC分析）で各トリグリセリドを分析し、AAAの残存量を算出した（表6）。

【0066】

【表 6】

表6 エステル交換反応の温度の影響

反応温度	AAA残存量 (%)	AAA減少率 (%、24時間当たり)
反応前	6.37	
30℃	5.86	9%
45℃	4.50	29%
55℃	2.43	62%

【0067】

エステル交換反応は60℃以下で行うことが常識とされているので、30℃、45℃、55℃で反応を行い反応性を確認した。表に示すように、エステル交換反応は反応温度が高いほど効率的に行えることが確認できた。このため、高温下での反応で酸化劣化を防ぐ意味で脱酸素の工程は重要になってくる。

【0068】

実施例8 リゾムコール・ミーハイ (*Rhizomucor miehei*) のリパーゼを固定化した酵素剤での検討

実施例5と同様に、添加する酵素の量は10%で、パーム油で希釈したSUNTGA40S (サントリー (株)、商品名) を用いて、実施例1で固定化し活性化したリゾプス・デレマー (*R. delemar*) のリパーゼと市販品として入手可能で水による活性化が不必要なリゾムコール・ミーハイ (*R. miehei*) の固定化リパーゼ (ベーリンガー・マンハイム社製、キラザイム L-9, c.-f., C2, lyo) のエステル交換活性を比較した。

【0069】

【表 7】

表7 R. delemar リパーゼと R. miehei リパーゼによるエステル交換反応

の比較

分子種	<u>R. delemar</u>	<u>R. miehei</u>
AAA	2. 86	2. 53
XAA	14. 95	14. 05
XXA	43. 33	44. 20

【0070】

実施例3で記載した方法（HPLC分析）で各トリグリセリドを分析し、各成分を算出した。表7に示すように、両酵素反応とも48時間、45℃で反応したが、AAAの減少とXXAの増加速度は両酵素ともほぼ同等で、本エステル交換反応に用いることができることを示している。

【0071】

実施例9 アラキドン酸を高含有するエステル交換反応による改良

本発明者らはモルティエラ属に属する微生物を培養することで、アラキドン酸を主たる構成脂肪酸としてなる油脂またはトリグリセリドを産生し得る微生物を得、工業スケールで発酵生産して精製油脂を得る方法を開示している（非特許文献4参照）。この方法によって得られたアラキドン酸を主たる構成脂肪酸としてなる油脂またはトリグリセリドを原料油脂として、実施例1の方法で脱酸素化し活性化した固定化酵素（R. delemar リパーゼ）を用いて植物油脂のパーム油とエステル交換した。40質量%のアラキドン酸を主たる構成脂肪酸としてなる油脂（250g）、パーム油（150g）、固定化酵素（40g）を45℃で48時間反応させた。反応原料油脂の97%はトリグリセリドの形態であり、構成脂肪酸としてのアラキドン酸が25%存在し、トリグリセリド中のトリーアラキドン酸（AAA）が6.37%存在した。このエステル交換反応で得られた油脂をろ過により、固定化酵素と分別し、トリグリセリドを95.1%、AAAを2.83%、XXA（アラキドン酸残基が1個結合したモノアラキドン酸）を42.3%含有するアラキドン酸高含有油脂またはト

リグリセリドを385g調製することができた。

【0072】

実施例10 ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) を高含有する油脂のエステル交換反応による改良

本発明者らはモルティエセラ属モルティエセラ亜属に属する微生物の変異処理を施すことにより、ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) を主たる構成脂肪酸としてなる油脂またはトリグリセリドを産生しうる微生物を得、工業スケールで醗酵生産して精製油脂を取る方法を開示している (特許文献9参照)。この方法によって得られたDGLAを主たる構成脂肪酸としてなる油脂またはトリグリセリドを原料油脂として、実施例1の方法で脱酸素化し活性化した固定化酵素 (*R. delemar* リパーゼ) を用いて植物油脂のパーム油とエステル交換反応した。40質量%のDGLAを主たる構成脂肪酸としてなる油脂 (25g)、パーム油 (15g)、固定化酵素 (4g) を45℃で48時間反応させた。反応初期にはトリグリセリドとして97.2%、構成脂肪酸としてのDGLAが25%存在し、トリグリセリド中のトリ-ジホモ- γ -リノレン酸 (DDD) が6.09%存在したが、本反応で、トリグリセリドは95.3%であり、DDDは3.03%にまで低減でき、アラキドン酸含有油脂またはトリグリセリドと同様にDGLAを主たる構成脂肪酸としてなる油脂中に含まれるDDDを減少させることができた。

【0073】

実施例11 アラキドン酸含有油脂 (粗油) の調製

アラキドン酸生産菌としてモルティエセラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68を用いた。保存菌株を、酵母エキス1%、グルコース2%、pH6.3の培地に接種し、往復振盪100rpm、温度28℃の条件にて種培養 (第一段階) を開始し、3日間培養した。次に、酵母エキス1%、グルコース2%、大豆油0.1%、pH6.3の培地30Lを50L容通気攪拌培養槽に調製し、これに種培養 (第一段階) 液を接種して、攪拌回転数200rpm、温度28℃、槽内圧150kPaの条件にて、種培養 (第二段階) を開始し、2日間培養した。次に、4500Lの培地 (培地A: 大豆粉270kg、KH₂PO₄ 16.2kg、MgCl₂·6H₂O 2.7kg、CaCl₂·2H₂O 2.7kg、大豆油 54kg)、を、121℃、20分の条件で滅菌した。別培地として、800Lの培地 (培地B:

含水グルコース108kg)を140℃、40秒の条件で滅菌して先の培地Aに加えて培地Cを調製した。培地CをpH6.1に調整した後、種培養液(第二段階)を接種して、計5400Lの初発培養液量(培養槽容積10kL)に合わせた。温度26℃、通気量49Nm³/hr、内圧200kPaで培養を開始した。また、表8に示すように培地流加を行ない、210時間の本培養を行なった。培養終了時は、培地流加による増加分と蒸発による減少分の影響で、7100Lの培養液量となった。

【0074】

【表8】

表8: 実施例1の培地流加

本培養時間	流加培地
19時間後	(含水グルコース243kg +大豆油54kg)/400L
43時間後	含水グルコース243kg/400L
67時間後	含水グルコース216kg/380L
91時間後	含水グルコース162kg/300L
120時間後	含水グルコース108kg/200L

【0075】

培養終了後、120℃、20分の条件で殺菌した後、フィルタープレスで湿菌体を回収し、流動層乾燥機で水分含量2質量%まで乾燥し、空気輸送機を用いて充填場所に乾燥菌体を輸送した。得られた乾燥菌体を、容積約100Lのアルミパウチ製袋に窒素ガスとともに充填し、バッグ口部をヒートシールシールした後、10℃以下の冷蔵室で保管した。

【0076】

コンテナバッグより取り出した乾燥菌体に、ヘキサン抽出を施し、ヘキサン溶液を濾過して含有固形分を除去した後、減圧下で加熱することによってヘキサンを除去し、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。

粗油を分析した結果、トリグリセリド含量94%、総脂肪酸中のアラキドン酸含

量29.6%であった。

【0077】

実施例12 実施例11で調製した油脂のエステル交換反応

実施例11で調製したアラキドン酸を29.6%含有する粗油（トリグリセリド94%）に植物油脂を添加せず、リパーゼのエステル交換反応のみを使って、本粗油の改良を試みた。リゾプス・デレマー（*R. delemar*）の固定化リパーゼを用いて、実施例1で記載した方法で脱酸素、活性化し、アラキドン酸を29.6%含有する粗油（40g）に活性化した固定化酵素（4g）を加えて45℃で48時間振とうして反応させた。反応開始時にはAAAが6.08%、XXAが24.15%の組成をした油脂が反応終了時にはAAAが3.21%、XXAが40.37%の組成であった。このような粗油を使った場合、植物油脂をわざわざ加えなくとも、実施例6、8で示されたように微生物産生高度不飽和脂肪酸を主たる構成脂肪酸としてなる油脂のエステル交換反応と同様にエステル交換されて油脂が改良されることが示された。

【0078】

実施例13 ミルクへの添加

粉ミルク100gに実施例9得られた修飾油脂1（新規エステル交換油脂）0.44gを添加することにより、ヒト母乳に近い調整乳を調製した。この調製乳の全脂肪酸に対するアラキドン酸の割合は0.5%となった。

【0079】

実施例14 バターへの添加

バター製造工程の攪拌操作（チャーニング）でバターミルクが除かれたバター脂肪100gに実施例9で得られた修飾油脂1（新規エステル交換油脂）を1.97g加えて練圧操作（ワーキング）を行い、均等な組成として、アラキドン酸を付加したバターを得た。

【0080】

実施例15 ジュースへの添加

β -デキストリン 2gを20%エタノール水溶液20mlに添加し、ここにスターラーで攪拌しながら、実施例9得られた修飾油脂1（新規エステル交換油脂）にビタミンEを0.05質量%配合し、これを100mgを加え、50℃で2時間インキュベートし

た。室温冷却（約1時間）後、さらに攪拌を続けながら 4℃で10時間インキュベートした。生成した沈殿を、遠心分離により回収し、n-ヘキサンで洗浄後、凍結乾燥を行い、アラキドン酸含有トリグリセリドを含有するシクロデキストリン包接化合物1.8gを得た。この粉末1gをジュース10Lに均一に混ぜ合わせ、アラキドン酸含有エステル交換油脂を含有するジュースを調製した。

【0081】

【発明の効果】

リパーゼのエステル交換反応を用いて、アラキドン酸に代表される高度不飽和脂肪酸含有油脂またはトリグリセリドを改良し、高度不飽和脂肪酸を分散させた形の油脂を製造する方法およびそれを含有する組成物およびそれらを含有する食品や健康食品を提供することができた。これらの油脂又はトリグリセリドは、消化吸収性が高く酸化劣化しにくい特性を有し、乳幼児用の調合乳、食品、健康食品の分野で応用が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はエステル交換反応におけるAAAの減少に及ぼすパーム油と大豆油の効果を示す。

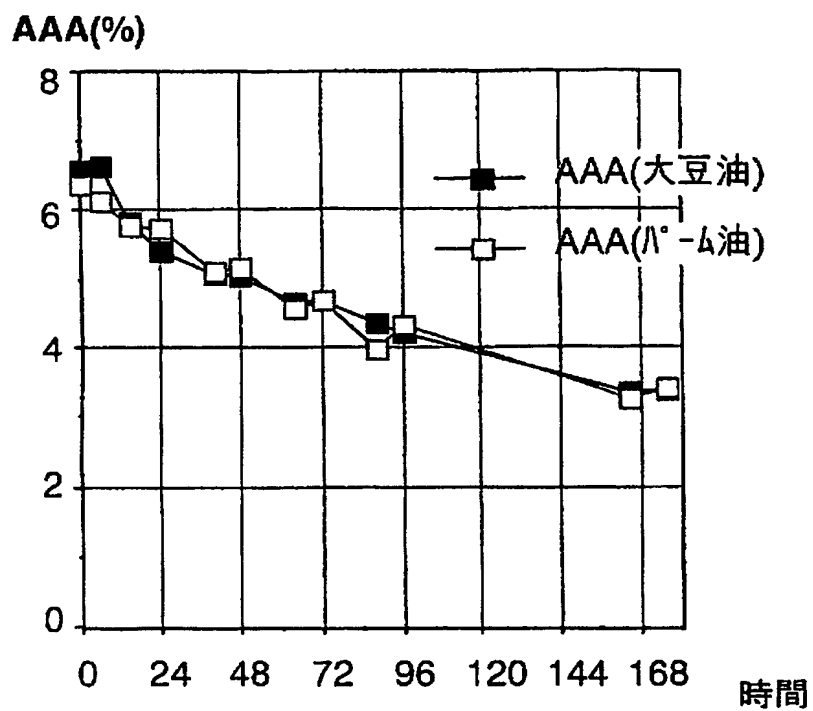
【書類名】

図面

【図 1】

図 1

エステル交換反応における AAA の減少に及ぼすパーム油と大豆油の効果



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 乳幼児用の調合乳、食品、健康食品の分野で応用が期待できる、消化吸収性が高く酸化劣化しにくい特性を有する、高度不飽和脂肪酸含有油脂またはトリグリセリドを得ること。

【解決手段】 高度不飽和脂肪酸含有油脂またはトリグリセリドと植物性油脂またはトリグリセリドとを1,3位特異的リパーゼを用いてエステル交換させる。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 2 - 2 6 8 7 2 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 9 0 4]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号

氏 名

サントリー株式会社